

P₂-プリン作動性受容体による心筋遅延整流性K電流の増大反応の解析

| | |
|-------------|--|
| 著者 | 松浦 博 |
| 発行年 | 1999-03 |
| その他の言語のタイトル | An analysis of the enhancement of delayed rectifier K ⁺ current by P ₂ -purinoceptor stimulation |
| URL | http://hdl.handle.net/10422/3791 |

P₂-プリン作動性受容体による 心筋遅延整流性K電流の増大反応の解析

(課題番号：09670048)

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 松 浦 博

(滋賀医科大学医学部教授)

ATP は心臓交感神経終末や副腎髄質細胞のクロム親和性顆粒にノルアドレナリンやアドレナリンとともに高濃度に貯蔵されており、交感神経の共伝達物質(co-transmitter)として働いていることが知られている。心臓自律神経による心筋膜興奮性の制御はその伝達物質による心筋イオンチャネル活性の修飾によることが知られており、近年のパッチクランプ法を用いた実験により明らかにされた ATP による心筋イオンチャネル活性の修飾は心臓交感神経による心筋膜興奮性の調節に関わっていると考えられている。

心筋細胞の遅延整流性 K^+ 電流(I_K)は細胞膜の脱分極により時間依存性に活性化されて外向き電流を発生し、活動電位の再分極を促進する生理的に重要な電流系である。また、 I_K はヒトを含む数種類のほ乳類心筋において、速い活性化動態をもち強い内向き整流性を示す急速活性型(I_{Kr})とその活性化が比較的遅く内向き整流性の弱い緩徐活性型(I_{Ks})の 2 つの電流成分から構成されていることが明らかにされている。

我々は、モルモット心房筋細胞において、ATP はその特異的受容体である P_2 -プリン作動性受容体 (P_2 -受容体) 刺激を介して I_K を増大させることを見いだしており (Matsuura *et al*, *J Physiol*, 1996) 本研究課題により、1) ATP により増大する I_K 成分の特定、ならびに 2) それに関わる細胞内情報伝達機構の解明に取り組んだ。その結果、1) ATP は I_{Kr} にはほとんど影響を与えずに I_{Ks} を選択的に増大させること(Matsuura & Ehara, *J Physiol*, 1997), ならびに 2) その情報伝達機構に cAMP 依存性蛋白キナーゼ (A キナーゼ) やリン脂質依存性蛋白キナーゼ (C キナーゼ) は関与しておらず、チロシンキナーゼを介する蛋白リン酸化反応が関与していることを示唆する実験結果を得た (Matsubayashi, Matsuura & Ehara, *Pflügers Arch*, 1999, in press). I_{Ks} は交感神経伝達物質であるノルアドレナリンやアドレナリンによる β -受容体刺激を介する A キナーゼの活性化、ならびに α -受容体刺激を介する C キナーゼの活性化により増大することが知られている。本研究により、 P_2 -受容体を介する I_{Ks} の増大反応はカテコールアミンによる β -および α -受容体を介する増大反応に付加的に作用することが示され、 P_2 -受容体を介する I_{Ks} の増大反応が交感神経刺激時の効率的な I_{Ks} の増大に貢献していることが予想された。

最近の遺伝性 QT 延長症候群 (LQTS) の遺伝子解析により、 I_{Kr} ならびに I_{Ks} チャネルはそれぞれ *HERG* 遺伝子ならびに *KvLQT1* 遺伝子によりコードされ、これらの遺伝子変異に起因する I_{Kr} (LQT2) ならびに I_{Ks} (LQT1) の減少が活動電位持続時間 (心電図上 QT 時間に相当) の延長、さらには torsade de pointes 型心室頻拍の発生、失神発作、急死という LQTS の病態に結びついていることが明らかにされた。本研究により明らかとなった ATP による I_{Ks} の増強作用がヒト心筋細胞においても観察されるか、さらには *KvLQT1* 遺伝子変異による I_{Ks} の減少に ATP が増強作用をもつか等、LQTS の治療薬としての ATP ならびに ATP 誘導体の可能性についての検討は大変興味のもたれるところである。

滋賀医科大学附属図書館



1998024656

研究組織

研究代表者：松浦 博（滋賀医科大学医学部教授）
（研究協力者：松林太朗 佐賀医科大学医学部大学院生
現佐賀医科大学医学部助手）

研究経費

| | |
|----------|----------|
| 平成 9 年度 | 2,000 千円 |
| 平成 10 年度 | 1,100 千円 |
| 計 | 3,100 千円 |

研究発表

(1) 学会誌等

Matsuura, H. and Ehara, T.

Selective enhancement of the slow component of delayed rectifier K^+ current in guinea-pig atrial cells by external ATP.

Journal of Physiology 503:45-54, 1997. （平成 9 年 8 月）

Sakaguchi, M., Matsuura, H. and Ehara, T.

Swelling-induced Cl^- current in guinea-pig atrial myocytes: inhibition by glibenclamide.

Journal of Physiology 505:41-52, 1997. （平成 9 年 11 月）

Hirahara, K., Matsubayashi, T., Matsuura, H. and Ehara, T.

Intracellular Mg^{2+} depletion depresses the delayed rectifier K^+ current in guinea pig ventricular myocytes.

Japanese Journal of Physiology 48: 81-89, 1998. （平成 10 年 2 月）

Matsubayashi, T., Matsuura, H. and Ehara, T.

On the mechanism of the enhancement of delayed rectifier K^+ current by extracellular ATP in guinea-pig ventricular myocytes.

Pflügers Archiv 1999 (in press). （平成 11 年発表予定）

(2) 口頭発表

松浦 博

P_2 -プリン受容体による心筋イオンチャネルの調節

平成 9 年度生理学研究学会「ATP 受容体の生理機能と分子機構に関する総合的基礎研究」（平成 9 年 8 月 29 日～30 日）

Matsuura, H., Matsubayashi, T. and Ehara, T.

Modulation of cardiac K^+ channels by extracellular ATP.

第71回日本薬理学会年会シンポジウム（平成10年3月23日～26日）

Matsuura, H., Matsubayashi, T. and Ehara, T.

Modulation of ion channel activities in guinea-pig atrial myocytes by ATP receptors.

第75回日本生理学会大会シンポジウム（平成10年3月27日～29日）

Matsuura, H., Sakaguchi, M. and Ehara, T.

Rapid and slow components of the delayed rectifier K^+ current in guinea-pig sino-atrial node cells.

第75回日本生理学会大会口演発表（平成10年3月27日～29日）

Matsubayashi, T., Matsuura, H. and Ehara, T.

Possible involvement of tyrosine phosphorylation in the enhancement of delayed rectifier K^+ current (I_K) by P_{2U} -purinoceptor stimulation.

第75回日本生理学会大会口演発表（平成10年3月27日～29日）

Matsuura, H.

Two components of delayed rectifier K^+ current in guinea-pig sino-atrial node cells.

25th SEIRIKEN International Symposium (COE), Ion Channels and Receptors in Cell Physiology
（平成11年1月27日～29日）

研究成果

本研究課題の成果を要約すると以下の通りである。なお、その詳細は添付した発表論文に記載する。

1. ATPによる P_2 -受容体刺激により増大する I_K 成分の特定に関する実験

酵素処理により得られたモルモット心房筋細胞において、 P_2 -受容体刺激により増大する遅延整流性カリウム電流 (I_K)は、急速活性型 (I_{Kr})、緩徐活性型 (I_{Ks}) のいずれの成分であるかを、パッチクランプ法による全細胞膜電流記録 (whole-cell recording) 実験により調べた。心房筋細胞の P_2 -受容体刺激は、細胞灌流液（細胞外液）中に種々の濃度 (1 - 50 μM)の ATP を添加する事により行った。本研究により以下の点が明らかになった。

(1) envelope test

コントロール時および細胞外 ATP (50 μM)存在下において、-40 mV の保持電位から種々の長さ (50-2000 ms)の脱分極パルス (+40 mV)を与え、 I_K の envelope test を行った。次に、subtractionにより求めた各長さのテストパルス中の ATP により増大した I_K 成分について、脱分極パルス中の外向き電流とその末尾電流の大きさの比を求めてみると、パルスの長さに関わらずほぼ一定 (約 0.4) の値を示した。

(2) 薬理学的実験

コントロール時において-30 mV から+40 mV の範囲に 500 ms の脱分極パルスを与えて I_K を活性化し、続いて I_{K_r} の選択的抑制剤である E-4031 (5 μ M) の存在下に同様の脱分極パルスを与え、 I_K を I_{K_r} (E-4031 感受性成分) と I_{K_s} (E-4031 抵抗性成分) に分離した。次に、細胞外 ATP (1, 50 μ M) 投与により I_K が増大したところで、同様に E-4031 を作用させて、 I_K を I_{K_r} と I_{K_s} とに分離し、それぞれの大きさをコントロールと比較すると、 I_{K_r} の大きさはほとんど不変で I_{K_s} のみが増大していた。

以上、(1)および(2)の実験結果により、 P_2 -受容体刺激は、緩徐活性型の遅延整流性カリウム電流(I_{K_s})を選択的に増大させることが明らかとなった。

2. P_2 -受容体刺激による I_{K_s} の増大反応に関わる細胞内情報伝達機構の解析

酵素処理により得られたモルモット心房筋ならびに心室筋細胞にパッチクランプ法を適用して全細胞膜電流記録(whole-cell recording)を行い、 P_2 -受容体刺激による緩徐活性型遅延整流性カリウム電流(I_{K_s})の増大反応に関わる細胞内情報伝達機構について検討を行った。本研究により以下の点が明らかになった。

(1) GTP 結合蛋白 (G 蛋白) の関与について

細胞内に G 蛋白の機能を阻害する GDP β S(guanosine 5'-O-(2-thiodiphosphate))を負荷すると ATP による I_{K_s} の増大反応はほとんど消失したため、この反応に G 蛋白の関与が示唆された。また、この ATP の作用は細胞の百日咳毒素処理によっては影響を受けなかったため、関与する G 蛋白は百日咳毒素非感受性のものであると考えられた。なお、G 蛋白の関与があることにより、 P_2 -受容体は G 蛋白共役型である P_2Y 型であることも示唆された。

(2) 蛋白リン酸化反応の関与について

(a) 細胞に非水解性 ATP アナログである ATP γ S (adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate))を負荷すると ATP による増大反応は不可逆的となったため、何らかの蛋白リン酸化反応の関与が示唆された。

(b) H-7 (10 μ M) および H-8 (5 μ M) 存在下において ATP の増大作用は影響を受けなかったために、A キナーゼならびに C キナーゼを介するリン酸化反応の関与は否定的であった。

(c) genistein (50 μ M) は部分的にはあるが ATP の作用を抑えたが、daidzein (50 μ M) は効果をおよぼさなかったため、チロシンキナーゼの関与が示唆された。

以上、(1)および(2)の実験結果により、ATP は P_2Y 型受容体を刺激して何らかのチロシンキナーゼを介する蛋白リン酸化反応を引き起こし I_{K_s} を増大させることが示唆された。